

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
22 août 2002 (22.08.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/064728 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12M 1/26,
1/00, G01N 35/00, G02B 21/36

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/00511

(22) Date de dépôt international :
11 février 2002 (11.02.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/01779 9 février 2001 (09.02.2001) FR

(71) Déposant et

(72) Inventeur : ATTIAS, Daniel [FR/FR]; 24, rue André Cit-
roën, F-92300 Levallois Perret (FR).

(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz,
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,

DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,
IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.



WO 02/064728 A2

(54) Title: INCUBATOR AND INCUBATION METHOD MONITORING THE ORGANISM TO BE INCUBATED

(54) Titre : INCUBATEUR ET PROCÉDE D'INCUBATION MENAGEANT L'ORGANISME MIS A INCUBER

(57) Abstract: The invention concerns an incubator comprising a sealed heat chamber provided with a door, a culture box with several wells, an organism and, more particularly an embryo, being in one of the wells of said box. The invention is characterised in that it comprises externally controlled means for removing the organism from the well wherein it is to place it in another well filled with a new culture medium. The invention also concerns a method for incubating organisms.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un incubateur comprenant une étuve étanche munie d'une porte, une boîte de culture à plusieurs puits, un organisme et, plus particulièrement un embryon, étant dans un des puits de ladite boîte, caractérisé en ce qu'il comprend un moyen commandé de l'extérieur, destiné à sortir du puits dans lequel il se trouve l'organisme pour le mettre dans un autre puits rempli d'un milieu de culture neuf. La présente invention concerne également un procédé d'incubation d'organismes.

INCUBATEUR ET PROCEDE D'INCUBATION MENAGEANT
L'ORGANISME MIS A INCUBER

5 La présente invention se rapporte aux incubateurs et aux procédés d'incubation d'organismes. Elle s'applique tout particulièrement pour mettre des embryons en culture et les surveiller dans des conditions de température et atmosphérique de développement les meilleures possibles.

10 Lors d'une fécondation *in vitro*, les spermatozoïdes et les ovules sont mis ensemble. Après cette mise en fécondation par fécondation *in vitro* classique ou micro-injection, les gamètes sont déposés
15 dans des milieux de cultures et entreposés dans un incubateur. Ils sont sortis quotidiennement, une à deux fois par jour, pour un changement de milieu, une observation au microscope, ou tout autre manipulation et ce, jusqu'au transfert *in utero* de l'embryon.

20 Au cours de ces différents changements de milieux et observations au microscope ou tout autre opération, les cultures embryonnaires sont exposées à de nombreux problèmes qui sont :

- 25 - les chocs thermiques de 37°C (température de l'incubateur) à 20°C (température ambiante à laquelle s'effectue le changement de milieu et l'observation au microscope),
- les variations de la concentration en CO₂ qui entraînent des variations du pH des milieux de culture,
- 30 - l'altération des propriétés nutritives des milieux, par les variations de température avec l'apparition de produits toxiques pour l'embryon,
- la mise à la lumière des embryons lors de leurs
35 observations au microscope,

- les manipulations embryonnaire traumatiques,
- les risques de contaminations bactériennes et mycologiques,
- le changement tardif de milieux qui entraîne une augmentation de la concentration de radicaux libres et une diminution de la concentration en substrat,
- les erreurs de manipulation avec perte d'embryons.

Certains des problèmes cités ci-dessus auxquels sont confrontés les embryons peuvent avoir des effets très néfastes sur ces derniers. En effet, il a été montré qu'un embryon placé pendant plus de trois minutes à une température de 22°C n'est plus capable de se développer.

L'invention remédie à ces inconvénients par un incubateur et par un procédé d'incubation qui supprime les chocs thermiques et les risques de contaminations bactériennes et mycologiques tout en facilitant le changement de milieux et en l'automatisant de manière à diminuer les erreurs de manipulation et les manipulations traumatiques. L'invention utilisée dans le cadre de la fécondation *in vitro* permet donc d'améliorer le nombre d'embryons viables et de bonne qualité.

Dans le cadre de l'invention, on entend par « organisme », non seulement les gamètes (ovocytes et spermatozoïdes), les ovocytes fertilisés, les cultures embryonnaires et les embryons mais aussi toute culture cellulaire comme des cellules souches, des microorganismes pathogènes ou non, etc...

L'invention a donc pour objet un incubateur comprenant une étuve étanche munie d'une porte, une boîte de culture à plusieurs puits placée dans l'étuve, un organisme étant dans un des puits de ladite boîte, caractérisé en ce qu'il comprend un moyen commandé de

l'extérieur, destiné à sortir du puits dans lequel il se trouve l'organisme pour le mettre dans un autre puits rempli d'un milieu de culture neuf. De façon avantageuse, dans le cadre de la présente invention, le moyen, commandé de l'extérieur, destiné à sortir du puits l'organisme pour le mettre dans un autre puits rempli d'un milieu de culture est une pipette.

Ainsi, on n'a plus à sortir la boîte de culture pour sortir l'organisme, et notamment l'embryon, de son puits, remplacer le milieu de culture et replacer l'embryon dans le puits. On peut maintenant, sans sortir l'embryon de l'incubateur, le sortir du puits dans lequel il se trouve pour le mettre dans un puits suivant rempli d'un milieu de culture qui n'a pas encore été en contact avec un embryon et qui est donc exempt de toxines, ce milieu étant ci-après appelé « milieu de culture neuf ». Le passage de l'embryon d'un puits de culture au suivant peut s'effectuer d'une manière précise, bien que l'étuve reste fermée, grâce à un microscope qui permet de surveiller les opérations sur l'écran de visualisation. On peut suivre l'évolution de l'organisme aussi souvent qu'on le souhaite sans que les opérations impliquées par ce suivi lui soient néfastes.

Suivant l'invention, le microscope est monté à l'intérieur ou à l'extérieur de l'étuve de manière à observer la culture de l'organisme et à surveiller les différentes manipulations (transfert de l'organisme d'un puits à l'autre et remplissage des puits), le microscope étant relié à un écran de visualisation placé à l'extérieur de l'étuve. Que le microscope soit à l'intérieur ou à l'extérieur de l'étuve, dans les deux cas, la platine du microscope se trouve à l'intérieur de l'étuve. Si le microscope se trouve à l'intérieur de l'étuve, un caisson de protection peut être nécessaire à

son fonctionnement dans les conditions de température et de concentration en N₂, en O₂ et en CO₂ à l'intérieur de l'étuve. Le microscope avantageusement utilisé dans le cadre de l'invention possède un filtre qui protège l'organisme des effets délétères de la lumière, lors de son observation au microscope. De plus, l'incubateur objet de la présente invention accepte des variantes avec un microscope avec une platine fixe ou mobile et/ou un microscope avec un axe fixe ou mobile.

L'incubateur objet de la présente invention peut être divisé en zone et comprendre au moins :

- une « zone interventionnelle » qui est dédiée à l'observation et aux différentes manipulations des embryons (remplissage de milieux et changement des puits),

- une « zone d'incubation » dédiée au stockage des boîtes de culture.

- une zone additionnelle qui peut être commune avec la « zone interventionnelle » et qui est dédiée au stockage des consommables (milieux, cônes) et à l'évacuation des déchets.

Les trois différentes zones peuvent se trouver sur un même niveau ou sur des niveaux différents.

L'incubateur objet de la présente invention comprend des moyens, commandés de l'extérieur de l'étuve, de déplacement pas à pas dans l'étuve des boîtes de culture à plusieurs puits. Tout moyen de déplacement pas à pas d'une boîte de culture est utilisable dans le cadre de la présente invention. De façon avantageuse, le moyen de déplacement utilisé est constituée par :

- soit une bande convoyeuse sans fin entraînée par un rouleau moteur, lui-même entraîné en rotation par

un moteur pas à pas commandé par un ordinateur par l'intermédiaire d'une ligne de commande,

- soit un bras manipulateur articulé, commandé par un ordinateur, capable de prélever la boîte de culture à traiter et de l'acheminer vers la zone interventionnelle, le bras manipulateur pouvant avoir un déplacement linéaire ou rotatif.

On peut prévoir d'emplir à l'avance tous les puits de l'étuve de milieu de culture. Mais pour empêcher que le milieu de culture ne s'évapore ou ne se contamine avant même que l'embryon ait été placé dans le puits, on préfère que l'incubateur comprenne une source de milieu de culture communiquant avec un conduit à vanne débouchant au dessus d'un puits et des moyens de commande de la vanne de manière à déverser dans le puits une quantité prescrite du milieu de culture. La source de milieu peut être à l'extérieur de l'incubateur ou peut être prévue dans celui-ci, par exemple, dans une zone dédiée au stockage des consommables. Juste avant que le puits en question reçoive l'embryon, on l'emplit du milieu de culture. De préférence, le conduit débouche au-dessus du puits se trouvant audit emplacement, ce qui permet là encore de surveiller les opérations à l'aide du microscope.

Suivant un autre mode de réalisation préféré également, le conduit débouche au dessus du puits juste en amont du puits se trouvant audit emplacement. On peut ainsi effectuer simultanément le remplissage de ce puits en amont et sortir l'embryon du puits se trouvant audit emplacement en l'aspirant à l'aide de la pipette. On dispose également de plus de place pour faire arriver le conduit au-dessus du puits.

On peut également envisager que l'incubateur objet de la présente invention comprend des moyens de

déplacement de la vanne utile pour le remplissage de milieu d'un puits à l'autre.

Dans le cadre de la présente invention, d'autres moyens pour remplir de milieu les puits des boîtes de culture sont envisageables. On peut également envisager l'utilisation d'une seringue motorisée et commandée de l'extérieur qui aspire directement le milieu dans un flacon se trouvant dans la zone dédiée au stockage des consommables et le distribue dans le puits en inversant la motorisation de la seringue. Le milieu à distribuer peut également être prélevé dans un flacon par un système de prélèvement commandés de l'extérieur, comme, par exemple, un cône à usage unique, puis distribué dans le puits.

L'étuve présente avantageusement des conditions de température et de concentration en N_2 , en O_2 et en CO_2 idéales pour le développement des cultures cellulaires et, plus particulièrement, des cultures embryonnaires. Ces conditions sont avantageusement une température à $37^\circ C$ et une atmosphère à 5% d' O_2 , 5% de CO_2 et 90% de N_2 . De façon avantageuse, l'incubateur objet de la présente invention est équipé de capteurs permettant l'autorégulation et la surveillance de l'atmosphère à l'intérieur de l'étuve. Grâce à ces capteurs, il est possible de contrôler, pendant toute la durée de la culture, la température et la concentration en N_2 , en O_2 et en CO_2 . Tout capteur apte à mesurer des variations de température et de concentration en N_2 , en O_2 et en CO_2 , dans les conditions de l'étuve, est utilisable dans le cadre de la présente invention.

L'invention vise également un procédé d'incubation d'un organisme, qui consiste à mettre l'organisme dans une étuve étanche, à l'incuber dans un

puits de culture rempli d'un milieu de culture et à le changer n fois le milieu de culture, n étant un nombre entier supérieur à 1 et inférieur à 50, caractérisé en ce qu'il consiste

5 i) à mettre l'organisme dans l'un d'une série de $(n+1)$ puits d'une boîte placée dans l'étuve, alors que les n autres puits de la série sont exempts de tout organisme,

10 ii) à déplacer, sans le sortir de l'étuve, l'organisme du puits dans lequel il se trouve pour le mettre dans le puits suivant de la série rempli d'un milieu neuf et

 iii) à répéter le déplacement au plus autant de fois qu'il reste de puits disponibles.

15

Toutes les opérations se font à l'intérieur de l'incubateur sous la surveillance du microscope et peuvent être commandées automatiquement par un ordinateur.

20 Pour sortir l'embryon, on met la pipette dans le puits se trouvant à l'emplacement qu'observe le microscope, on aspire l'organisme, on sort la pipette du puits, on fait venir le puits suivant audit emplacement, on plonge la pipette dans ce nouveau puits, on relâche l'embryon de la pipette dans le puits et on retire la
25 pipette du puits. La manipulation de l'embryon est ainsi très ménagée, assistée et voire automatisée, ce qui diminue beaucoup les dangers d'accidents et de traumatismes.

30 Suivant une variante, le procédé objet de la présente invention consiste à observer au microscope du virage de couleur du milieu de culture contenant un indicateur et contenu dans le puits d'une série de $(n+1)$ puits colorés dans lequel se trouve l'organisme et à changer l'organisme de puits lors de ce virage. En effet,
35 on observe, de préférence souvent ou en continu, au

microscope le virage de couleur du milieu de culture auquel on a ajouté un indicateur coloré, notamment de pH, par exemple du rouge phénol. On est ainsi averti du moment exact où il convient de changer de puits. On peut aussi, à l'effet de surveiller le virage de couleur, prévoir dans l'étuve un densitomètre optique à l'intérieur de l'étuve et des moyens pour amener le signal fourni par le densitomètre à l'extérieur de l'étuve, notamment des moyens acoustiques par une alerte.

10

On peut prévoir d'autres manipulations que le changement de milieu de culture dans ce dispositif adapté aux cultures embryonnaires comme la recherche d'ovocyte dans le liquide folliculaire, la préparation des gamètes, la décoronisation ovocytaire, la micro-injection, l'éclosion assistée et la maturation ovocytaire...

15

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent concernant des modes de réalisation particuliers de la présente invention dans lesquels il est fait référence à :

20

- la figure 1 qui représente une vue schématique en coupe d'un incubateur selon l'invention,
- les figures 2 et 3 qui représentent deux différents types d'incubateur objet de l'invention.

25

La vue schématique en coupe de l'incubateur suivant l'invention, représentée à la figure 1 montre qu'il comporte une étuve 1 étanche munie d'une porte 2 pouvant être fermée de manière étanche. A l'intérieur de l'étuve 1 est montée une bande 3 convoyeuse sans fin entraînée par un rouleau 4 moteur et passant sur un rouleau 5 de renvoi. Le rouleau 4 moteur est entraîné en rotation par un moteur 6 se trouvant à l'extérieur de l'étuve 1, mais pouvant être également prévu à l'intérieur de celle-ci, et qui, en

30

35

l'espèce, est relié au rouleau 4 moteur par une ligne 7. Le moteur 6 pas à pas est commandé par un ordinateur 8 par l'intermédiaire d'une ligne 9 de commande. Sur le brin supérieur du convoyeur 3, est placée une boîte 10 de culture comprenant trois puits 11a, 11b et 11c. Le puits 11a est en amont du puits 11b dans le sens de déplacement F du convoyeur, tandis que le puits 11c est en aval. La boîte 10 est maintenue sur le convoyeur 3 par des contreforts 12 qui l'empêchent de se déplacer de manière intempestive.

Au dessus de l'emplacement où se trouve à la figure le puits 11b, est monté fixe un microscope 13 qui est relié par une ligne 14 à un dispositif 15 de visualisation permettant de voir le puits 11b se trouvant à cet emplacement. A ce même emplacement arrive également une pipette 16 commandée par l'ordinateur 8 par l'intermédiaire d'une ligne 17. L'ordinateur 8 est relié par une ligne 18 à une manette 19 permettant de commander la pipette et notamment de la descendre dans le puits se trouvant audit emplacement, en l'occurrence à la figure dans le puits 11b, ou de l'en faire sortir et permettant d'aspirer une partie du contenu du puits 11b, ou de l'en faire sortir et permettant d'aspirer une partie du contenu du puits 11b ou de relâcher une partie de la pipette dans le puits qui se trouvera à cet emplacement.

Sur une console 20 prévue à l'intérieur de l'étuve 2 est portée une bouteille 21 de milieu de culture qui, par un conduit 22 muni d'une vanne 23, débouche au-dessus du puits 11a ou, suivant une variante qui est représentée également à la figure, au dessus du puits 11b étant entendu que l'on utilise l'une de ces variantes, mais non pas les deux en même temps.

Un densitomètre 24 optique à sonnerie de seuil permet de suivre la densité optique du milieu de culture du puits 11b.

Pour mettre l'embryon en culture, on ouvre la porte 2 de l'étuve 1 et on le met dans le puits 11c, rempli de milieu de culture, dans l'étuve 1, alors que les puits 11a et 11b sont vides, étant entendu qu'ils pourraient aussi être déjà remplis de milieu de culture. On a donc une série de trois puits 11a, 11b et 11c dont un seul contient un embryon. On referme la porte 2. On ne l'ouvrira plus jusqu'à ce que la culture soit terminée. On laisse l'embryon croître dans le puits 11c qui se trouve alors en dessous du microscope 13 avec possibilité, grâce à ce microscope et éventuellement du densitomètre 24, d'observer ce qui s'y passe et, le cas échéant, de décider du meilleur moment où il convient de changer le milieu de culture. On peut également décider de changer de milieu de culture après une durée déterminée. Lorsque l'on décide de changer le milieu de culture, on abaisse la pipette 16 dans le puits 11c, on fait passer par aspiration l'embryon du puits 11c dans la pipette 16, on retire la pipette 16 du puits 11c et on fait avancer d'un pas le convoyeur 3 pour amener maintenant le puits 11b en regard du microscope 13 à l'emplacement où se trouvait auparavant le puits 11c. On abaisse ensuite la pipette 16 dans le puits 11b pour obtenir la position représentée à la figure. On emplit le puits 11b de milieu de culture à l'aide de la bouteille 21 du conduit 22 et de la vanne 23, si l'on n'avait pas déjà effectué cette opération auparavant, puis on abaisse la pipette 16 et on relâche l'embryon dans le puits 11b en observant sur le dispositif 15 de visualisation que ces opérations s'effectuent correctement. On retire ensuite la pipette 16 du puits 11b. On recommence ensuite les opérations qui viennent d'être indiquées, mais le puits 11a prenant la place du puits 11b et le puits 11b jouant le rôle qu'avait joué auparavant le puits 11c.

Bien entendu, il est possible de modifier le dispositif de déplacement des puits en vue de les mettre à

l'emplacement se trouvant sous le microscope 13, par exemple à l'aide d'un tourniquet ou autre. Et il est également possible de prévoir plusieurs séries de puits 11a, 11b et 11c avec un plus grand nombre de puits par série et un moyen propre de déplacement de chaque série de puits.

Les figures 2 et 3 présentent deux types d'incubateurs capables de contenir chacun plusieurs boîtes de culture.

L'incubateur de la figure 2 est un incubateur dans lequel la zone d'interventionnelle (A1), la zone dédiée au stockage des consommables (A2) et la zone d'incubation (B) se trouvent sur un même niveau. Un bras articulé et motorisé prélève la boîte à traiter dans la zone d'incubation (B) dédiée au stockage des boîtes et l'achemine vers la zone interventionnelle. Dans cette zone interventionnelle, se déroulent les différentes opérations du processus que sont le changement de puits des embryons et le remplissage avec du milieu de culture des puits. Dans ce cas de mise en œuvre de l'invention, seule la boîte à traiter est manipulée. De plus, chacune des boîtes est définie par sa position (x,y) dans la zone d'incubation ce qui permet de les ranger de façon logique et cohérente et d'éviter les erreurs entre boîtes et donc entre cultures.

L'incubateur de la figure 3 est un système composé de deux étages. Sur le premier (E1), les boîtes sont stockées, cet étage correspondant donc à la zone d'incubation (A). Le plateau est fixe. Un sas permet l'introduction de 4 boîtes simultanément. Le second étage (E2) est l'étage d'intervention auquel on passe via un bras manipulateur. L'axe du microscope est fixe et la platine du microscope sur laquelle est placée la boîte à observer se déplace en x et en y, le microscope se déplaçant en z pour la mise au point. Au centre du plateau (C) sont stockés les

consommables et sont effectuées les opérations de
prélèvement des milieux et cônes et leur évacuation.

REVENDICATIONS

5 1) Incubateur comprenant une étuve étanche
munie d'une porte, une boîte de culture à plusieurs puits
placée dans l'étuve, un organisme étant dans un des puits
de ladite boîte, caractérisé en ce qu'il comprend un moyen
commandé de l'extérieur, destiné à sortir du puits dans
10 lequel il se trouve l'organisme pour le mettre dans un
autre puits rempli d'un milieu de culture neuf.

2) Incubateur selon la revendication 1,
caractérisé en ce que ledit moyen commandé de l'extérieur,
destiné à sortir du puits dans lequel il se trouve
15 l'organisme pour le mettre dans un autre puits rempli d'un
milieu de culture est une pipette.

3) Incubateur selon l'une quelconque des
revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend un
20 microscope qui permet d'observer la culture de l'organisme
sur un écran de visualisation placé à l'extérieur de
l'étuve.

4) Incubateur selon la revendication 3,
25 caractérisé en ce que la platine dudit microscope se
trouve à l'intérieur de l'étuve.

5) Incubateur selon l'une quelconque des
revendications 3 ou 4, caractérisé en ce ledit microscope
30 possède un filtre qui protège l'organisme des effets
délétères de la lumière.

6) Incubateur selon l'une quelconque des
revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il
35 comprend des moyens, commandés de l'extérieur de l'étuve,

de déplacement pas à pas dans l'étuve d'une boîte de culture à plusieurs puits.

5 7) Incubateur selon la revendication 6, caractérisé en ce que le moyen de déplacement pas à pas de la boîte de culture est constitué par :

10 - soit une bande convoyeuse sans fin entraînée par un rouleau moteur, lui-même entraîné en rotation par un moteur pas à pas commandé par un ordinateur par l'intermédiaire d'une ligne de commande,

15 - soit un bras manipulateur articulé, commandé par un ordinateur, capable de prélever la boîte de culture à traiter et de l'acheminer vers une zone interventionnelle, le bras manipulateur pouvant avoir un déplacement linéaire ou rotatif.

20 8) Incubateur selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une source de milieu de culture communiquant avec un conduit à vanne débouchant au dessus d'un puits et des moyens de commande de la vanne de manière à déverser dans le puits une quantité prescrite du milieu de culture.

25 9) Incubateur selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend des moyens de déplacement de ladite vanne d'un puits à l'autre.

30 10) Incubateur selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est équipé de capteurs permettant l'autorégulation et la surveillance de l'atmosphère à l'intérieur de l'étuve.

35 11) Procédé d'incubation d'un organisme, qui consiste à mettre l'organisme dans une étuve étanche, à l'incuber dans un puits de culture empli d'un milieu de

culture et à le changer n fois le milieu de culture, n étant un nombre entier supérieur à 1 et inférieur à 50, caractérisé en ce qu'il consiste

5 i) à mettre l'organisme dans l'un d'une série de $(n+1)$ puits d'une boîte placée dans l'étuve, alors que les n autres puits de la série sont exempts de tout organisme,

10 ii) à déplacer, sans le sortir de l'étuve, l'organisme du puits dans lequel il se trouve pour le mettre dans le puits suivant de la série rempli d'un milieu neuf et

iii) à répéter le déplacement au plus autant de fois qu'il reste de puits disponibles.

15 12) Procédé suivant la revendication 11, caractérisé en ce qu'il consiste à observer au microscope le virage de couleur du milieu de culture contenant un indicateur et contenu dans le puits d'une série de $(n+1)$ puits colorés dans lequel se trouve l'organisme et à
20 changer l'organisme de puits lors de ce virage.

25 13) Procédé suivant la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce qu'il consiste à surveiller la densité optique dans l'incubateur et à changer de puits lorsque la densité optique dépasse un seuil proscrit.

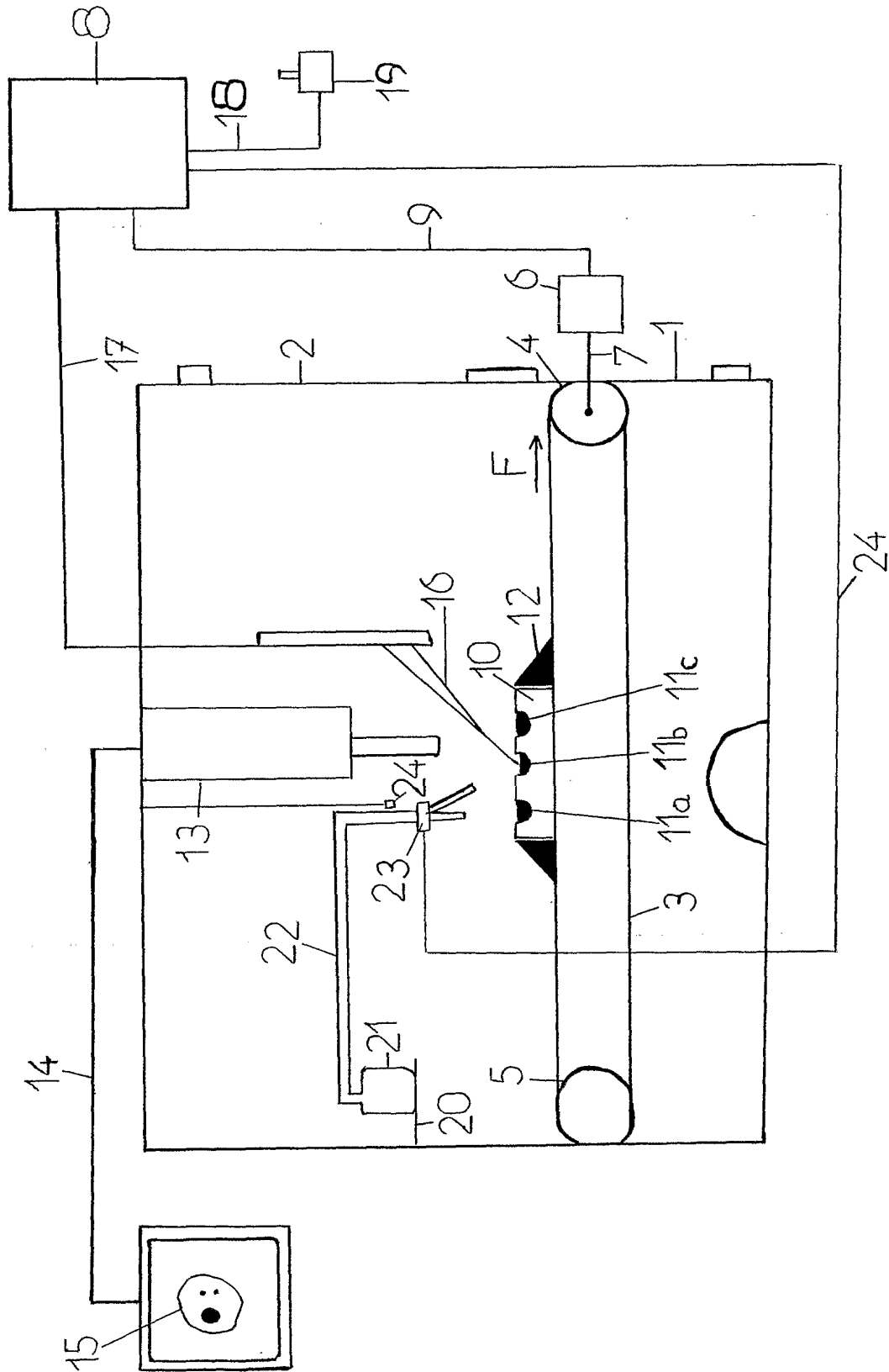


Figure 1

Figure 2

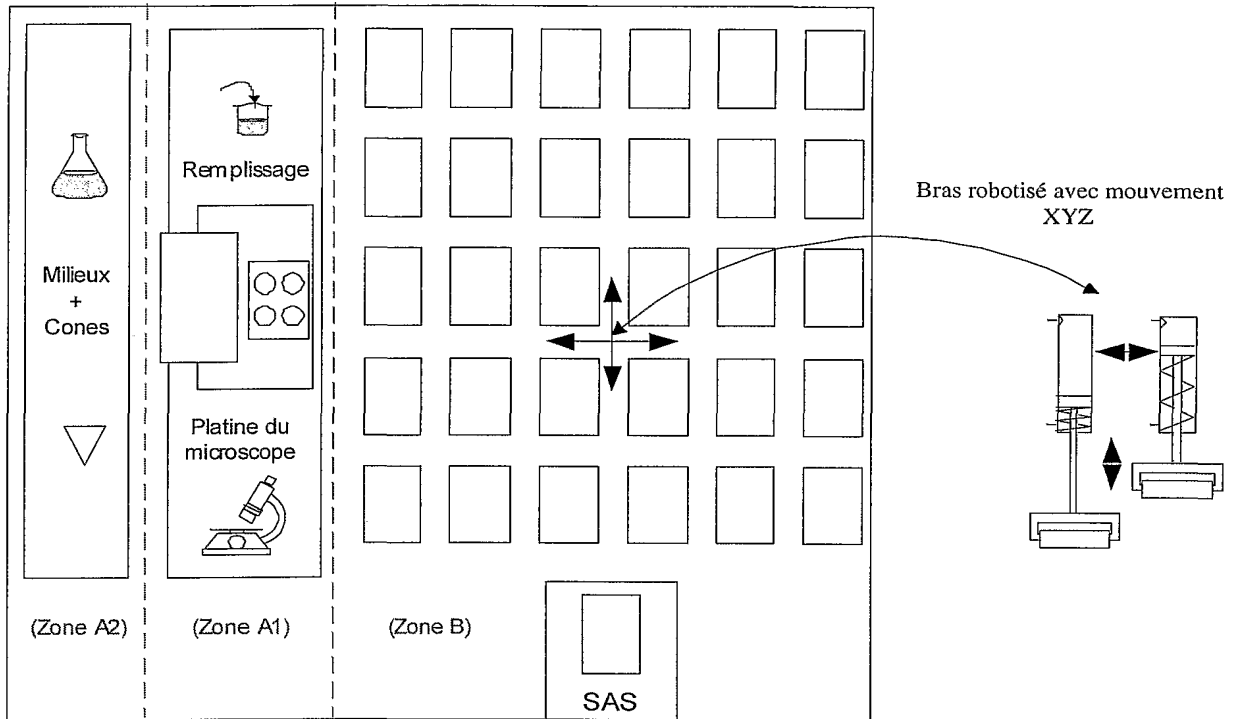


Figure 3

